

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین



پایان نامه کارشناسی ارشد (M.Sc)

رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

انتقال ژن به سلولهای بنیادی مزانشیمی از طریق نانوذرات
کیتوزان

اساتید راهنما

جناب آقای دکتر نعمت الله غیبی

جناب آقای دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد

استاد مشاور

سرکار خانم دکتر فاطمه باقری

نگارنده

الهام ملکوتی پور

سال تحصیلی 1390-1391

چکیده :

هدف: این مطالعه بررسی پتانسیل کیتوزان با وزن مولکولی های متفاوت و غلظتهای مختلف در انتقال ژن به سلولهای بنیادی مزانشیمی در شرایط بهینه می باشد.

مواد و روشها: نانوذرات کیتوزان/pDNA با استفاده از سه وزن مولکولی 18، 50 و 136 کیلودالتون کیتوزان و پلاسمید pTracer-CMV2 با استفاده از پروسه complex coacervation تهیه شدند این پلاسمید حاوی ژن گزارشگر GFP می باشد. بدین منظور غلظتهای متفاوتی از کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت. به جهت بررسی تشکیل کمپلکس، نمونه ها بر روی ژل آگاروز 0/8 % بارگزاری شدند. سائزوپتانسیل زتای نانوذرات با استفاده از نائوسائزر سنجش شد. مورفولوژی نانوذرات از طریق عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان انسان استخراج شده و مورد ترانسفکشن با غلظتهای متفاوت نانوذرات کیتوزان/pDNA قرار گرفت. در این زمینه شرایط pH، غلظت پلاسمید مورد استفاده و نیز مدت زمان انکوباسیون پس از ترانسفکشن بهینه سازی شد. سلولهایی که مورد ترانسفکشن با لیپوفکتامین قرار گرفتند به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. نرخ ترانسفکشن و میزان زیست پذیری سلولهای مورد مطالعه به ترتیب با فلوسایتومتری و تست MTT سنجش شد.

نتایج: کیتوزان با سه وزن مولکولی مورد مطالعه فقط در غلظتهای 1، 0/5، 0/1 و 0/05% نانوذره تشکیل دادند. کوچکترین سائز کمپلکس های تشکیل شده در ذرات کیتوزان با وزن مولکولی 50 کیلو دالتون و بیشترین پتانسیل زتا در کیتوزان 136 کیلودالتونی دیده شد بالاترین کارایی (43/18%) در ترانسفکشن

با کیتوزان 18 کیلودالتون با غلظت 0/1٪ و 10 میکروگرم پلاسمید در pH:6.8 و با 72 ساعت انکوباسیون پس از ترانسفکشن بدست آمد. لیپوفکتامین منجر به ترانسفکشن 40/57٪ از سلولها شد. نتایج حاصل از تست MTT 95/5٪ زیست پذیری را برای سلولهای ترانسفکت شده با کیتوزان 18 کیلودالتون با غلظت 0/1٪ نشان داد در حالی که لیپوفکتامین منجر به 60٪ زیست پذیری شد.

نتیجه گیری: نانوذرات حاصل از پلاسمید و کیتوزان با وزن مولکولی 18 کیلو دالتون و غلظت 0/1٪ یک سیستم انتقال ژن امید بخش به سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می باشد. با وجودی که نرخ ترانسفکشن نانوذرات کیتوزان پایین تر از لیپوفکتامین می باشد اما زیست پذیری به مراتب بالاتری نسبت به آن ایجاد می کنند.